



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Monitorování hladiny vitamínu D u dětí

Monitoring of vitamin D level in childrenpopulation

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Hana Kalábová

Tereza Jirková

Kladno, květen 2017

Zadání bakalářské práce

Student: **Tereza Jirková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Monitorování hladiny vitamínu D u dětí**
Téma anglicky: Monitoring of vitamin D level in children population

Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude sledování hladin vitamínu D u dětí. Teoretická část bude zaměřena na charakteristiku vitamínu D, jeho význam, metabolismus a funkci. Popíše zdroje příjmu a tvorby vitamínu D a metody laboratorního stanovení jeho hladiny. V období bez slunečního záření je organismus odkázán na příjem vitamínu D potravou. Práce bude pojednávat o projevech nedostatku vitamínu D, který se projeví zejména na kostním systému a vzniká tak onemocnění křivice, ale i na hypervitaminozu, což působí na organismus toxicky. Práce se dále bude zabývat účinkem vitamínu D na kostní, ale i jiné tkáně organismu v dětské populaci. V praktické části budou statisticky, pomocí grafů a tabulek, zpracována data z laboratoře klinické biochemie. Soubor pacientů (dětí 5 - 15 let) poskytne Oblastní nemocnice Kladno.

Seznam odborné literatury:

- [1] BAYER, Milan, Křivice u dětí, ed. 11, číslo 1, 2009, Postgraduální medicína, s. 62-67, ISSN: 1212-4184
- [2] TLÁSKAL, Petr, Význam vitamínu D v pediatrické praxi, ed. 10, číslo 1, 2014, Praktické lékařství, s. 12-15, ISSN: 1801-2434
- [3] HOUSTĚK Josef, Dětské lékařství, ed. 3., Praha: Avicenum, 1990, 516 s., ISBN 80-201-0032-6

Zadání platné do: 11.09.2018
Vedoucí: Ing. Hana Kalábová
Konzultant: Mgr. Romana Šíroká, Ph.D.

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 05.12.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Monitorování hladiny vitamínu D u dětí vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 18.05.2017

.....
podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí této bakalářské práce Ing. Haně Kalábové, za ochotu vést tuto práci, za čas, který mi věnovala i za cenné informace, které mi poskytla. Dále bych chtěla poděkovat odborné konzultantce Mgr. Romaně Široké, PhD., za ochotu a poskytnutí dat a informací ke zpracování praktické části.

Abstrakt

Tato bakalářská práce podává přehled o metabolismu vitamínu D, monitorování jeho hladiny a význam při vývoji dětského organismu. Vitamin D je u dětí zásadní pro správný vývoj skeletu. Doporučený příjem vitamínu D je 20-25 µg. Při nedostatečném přísunu vitamínu D, hypovitaminoze, dochází k onemocnění, zvaném křivice. Projevy tohoto závažného onemocnění a typické známky jsou patrné z rentgenových snímků. Křivice postihuje zejména kosti horních a dolních končetin.

Stanovení hladiny vitamínu D je založené na imunoanalýze a stanovuje se 25-hydroxyvitamin D. Ze souboru klinických dat byly vybrány vzorky pacientů ve věku do 15 let a tato data byla statisticky zpracována. Studovaná byla závislost hladiny vitamínu D na věku pacienta a na ročním období.

Klíčová slova

vitamin D; křivice; 25-hydroxyvitamin D; imunoanalýza

Abstract

Vitamin D is one of the most important vitamin, especially for children and their correct evolution specialized to their skeleton. This bachelor's provides an overview of the needs and action in child's organism. After that, there is accurate description of grave illness, rickets, which is typical of vitamin D. It mainly affects bones of limb at children skeleton and it has typical symptoms on X-ray image.

The practical part provides an overview of the methods for investigate the vitamin D deficiency. More details description of method, especially immunoassay, and diagnostic devices, which measured values of vitamin D, is in second part of this thesis. According to graphically processed data, it is possible to evaluate how often the vitamin deficiency or excess of vitamin in children occurs, focus to children ages 5 to 15 years, measured from 2013 to 2016.

Keywords

vitamin D, rickets; 25-hydroxyvitaminD; immunoassay

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Současný stav	10
2.1	Vitamin D	11
2.1.1	Zdroje vitaminu D	11
2.1.2	Dávkování, příjem vitaminu D v dětském věku.....	12
2.2	Působení vitaminu D v organismu.....	13
2.2.1	Funkce vitaminu D	15
2.3	Působení vitaminu D s vápníkem	15
2.3.1	Parathormon	16
2.3.2	Kalcitonin	16
2.4	Hypovitaminoza	17
2.4.1	Vitamin D a diabetes mellitus	18
2.4.2	Vitamin D a imunitní systém.....	18
2.5	Křivice (Rachitis)	19
2.5.1	Souhrn příznaků charakterizující rachitidu	20
2.5.2	Laboratorní vyšetření	22
2.5.3	Rentgenové vyšetření	22
2.6	Léčba deficitní křivice	24
2.6.1	Dávkování vitaminu D perorálně	25
2.6.2	Dávkování vitaminu D muskulárně	25
2.7	Prevence	26
2.8	Dědičné poruchy metabolismu vitaminu D.....	26
2.8.1	Vitamin D- dependentní rachitida typu I.....	27
2.8.2	Vitamin D- dependentní rachitida typu II	27
2.8.3	Familiární hypofosfatemická vitamin D- rezistentní rachitida	28
2.9	Hypervitaminóza D	29

2.9.1	Projevy otravy a terapie	29
3	Cíl práce	30
4	Metodika	31
4.1	Chromatografické metody	31
4.1.1	Hmotnostní spektrometrie	32
4.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	32
4.2	Imunologické metody	33
4.2.1	Radioimunoanalýza	34
4.2.2	Enzymová imunoanalýza	34
4.2.3	Luminiscenční imunoanalýza	34
4.3	Postup stanovení 25(OH)D	35
4.3.1	Imunoanalyzátor Cobas e 411	35
4.3.2	Princip testu na imunoanalyzátoru	36
4.3.3	Výsledné hodnoty	37
5	Výsledky	38
6	Diskuze	42
7	Závěr	45
8	Seznam použitých zkratk	46
9	Seznam použité literatury	48
10	Seznam použitých obrázků	51
11	Seznamu použitých tabulek	52
12	Seznam použitých grafů	53

1 ÚVOD

Vitaminy jsou nezbytnou součástí zdravého životního stylu a jsou potřebné pro správný chod organismu. V současné době jsou všechny typy vitaminů v evropské populaci plně dostupné a riziko onemocnění z jejich nedostatku je tedy minimální. Tato bakalářská práce je zaměřena na vitamin D a jeho výskyt u dětí. Přísun vitaminu je u dětského organismu nezbytný, především pro jejich organismus, který se teprve vyvíjí. Kromě potravin je vitamin D přijímán ze slunečních paprsků. Dbát by se mělo na přísun tohoto vitaminu u ještě nenarozených dětí, který se projeví na vývoji a správném růstu jejich kostí. Vitamin D a jeho působení v organismu je spojeno s dalšími potřebnými látkami, mezi které patří hlavně vápník a fosfor.

Nedostatek vitaminu D u dětí má největší vliv na vývoj kostí, u kterých důsledkem toho nedochází ke správnému ukládání vápníku do kosti. Kostní tkáň tak není plně funkční pro svůj vývoj. Nejzávažnější onemocnění u dětí, spojované s nedostatkem vitaminu D a nedostatečným příjmem vápníku, je křivice. Křivice se objevovala spíše v 18. a 19. století. V současné době, kdy je zavedena suplementace vitamínu D, je toto onemocnění ojedinělé. Příznaky křivice jsou zřejmé zejména z rentgenového vyšetření, u kterého se vyskytují typické známky postižení skeletu dítěte.

Stanovení vitaminu D, které se provádí v laboratoři klinické biochemie, je založeno nejen na imunologických metodách, u kterých se stanovuje především metabolit vitamínu D, 25- hydroxyvitamin D.

Cílem této bakalářské práce je informovat čtenáře o základních poznatcích, týkající se vitaminu D, jeho působení v organismu a onemocnění, vyskytující se u dětí z jeho nedostatku. Také nabízí přehled graficky zpracovaných naměřených hodnot dětí, u kterých byl, od roku 2013 do roku 2016, vitamin D sledován. Graf je rozdělen podle ročního období, u kterého můžeme vidět, jaký vliv má sluneční záření na hladiny tohoto metabolitu během letních a zimních měsíců.

2 SOUČASNÝ STAV

Vitaminy jsou důležitou a nezbytnou součástí zdravého životního stylu člověka. Jsou to organické látky, které není organismus schopen si vytvářet, a které jsou důležitou součástí potravy. Nedostatečný přísun vitaminů se projeví na organismu různými způsoby, které jsou pro každý vitamin odlišný. Tyto látky jsou potřebné pro běžnou metabolickou činnost v organismu ^[1]. Svou přítomností urychlují a optimalizují děje v organismu, jako je například změna cukrů, tuků a bílkovin. Mezi vitaminy, které si organismus neumí vytvořit, patří i výjimky, a to:

- Vitamin K- tvořen bakteriemi, které se vyskytují v tlustém střevě
- Vitamin A- vzniká z karotenových prekurzorů (výchozí látka, ze které chemickou přeměnou vzniká výsledný produkt)
- Vitamin D- vzniká v kůži, působením slunečních paprsků

Tyto organické látky, které si organismus neumím vytvořit, je potřeba přijímat v malém množství, a to 10 mg denně. Vyskytují se i výjimky, například vitamin C, který je potřeba přijímat ve vyšším množství, 75 - 100 mg, kvůli svým pozitivním účinkům na organismus^[2]. Vitaminy se nejčastěji dělí na:

- Vitaminy rozpustné ve vodě- vitaminy B, C
- Vitaminy rozpustné v tucích- vitaminy A, D, E, K

V přijímané potravě je proto důležitý obsah daného množství tuku, kvůli nízkému vstřebávání vitaminu rozpustných v tucích. Nedostatek těchto vitaminů se může vyskytnout při obstrukční žloutence nebo při onemocnění pankreatu, a to i při jejich řádném příjmu v potravě. Nedostatečný příjem vitaminů neboli hypovitaminóza, se může vyjádřit poškozením jednotlivých činností organismu. Pokud má organismus příliš velký nedostatek vitaminu, který je označován termínem avitaminóza, může způsobit až závažné onemocnění. V již vyspělých státech, se s tímto termínem setkávámeojediněle.

V současné době, ve vyspělém potravinovém průmyslu, hypovitaminóza vzniká často jako důsledek poruchy vstřebávání potravy (celiakie, onemocnění pankreatu, jater,

obstrukční žloutenka), při zvýšené potřebě vylučování nebo v obdobích intenzivního růstu, intenzivní fyzické aktivity, stresu^[3]. Během vývoje lidského organismu je z hlediska výživy období dětského věku tím nejdůležitějším. V tomto období nastává fyzický i psychický rozvoj a růst organismu. Strava tedy patří k podstatné části ovlivňující vývoj a růst dítěte.

Během intenzivního růstu, kdy jsou vyšší požadavky, je vhodné příjem vitaminů upravit. Je doporučena pestrá strava, především ovoce, zelenina, mléko a mléčné výrobky. Případné určení doplňků stravy (suplementace) závisí na výsledcích z laboratorního biochemického vyšetření^[4].

2.1 Vitamin D

Vitamin D neboli kalciferol se vyskytuje ve 2 formách. Je to vitamin D₂, ergokalciferol a vitamin D₃, cholekalciferol, který je odvozený od cholesterolu^[5]. Působení cholekalciferolu je mnohem větší než působení ergokalciferolu^[4]. Aktivní forma vitaminu D patří mezi hormony, proto se tomuto vitaminu říká prohormon. Vitaminy jsou nezbytnou součástí při určitém ději, na kterém se podílejí. Pokud dojde k zvýšení vitaminu v organismu, nemá to na daný děj žádný vliv. Děj se tím neurychlí ani nezpomalí. Hormony se vyznačují tím, že nesou informaci o určitém ději, na který jsou potřeba. Například množství hormonu nám říká, jakou silou má děj probíhat, naopak co se má podílet na daném ději nám říká typ hormonu. Další rozdíl mezi vitaminy a hormony je, že větší část vitaminu si organismus není schopen sám vytvořit, naopak hormon je toho schopný^[6].

2.1.1 Zdroje vitaminu D

Vitamin D dodává tělu zejména živočišná potrava. Nejvíce se vyskytuje v oleji z tresčích jater, vejcích, játrech, mléku a rybách. Potraviny, ve kterých se tento vitamin vyskytuje, je znázorněn v tabulce 1. Ve formě potravy dojde k vstřebávání vitaminu D ve střevech. Tento vitamin se vytváří v organismu i z provitaminu- 7-dehydrocholesterolu, který se vyskytuje v pokožce. Pokud se tento provitamin ozáří ultrafialovými paprsky, při vlnové délce 290-320 nm, vytvoří se z něj vitamin D₃. Je-li dostatečný příjem slunění, není potřebný příjem vitaminu D potravou^[5]. Vitamin D₂, který je rostlinného původu,

se vytváří ozařováním ergosterolu - provitaminu D₂^[6]. Tato forma vitaminu neboliergokalciferol, se liší od cholekalciferolu pouze složením vedlejšího řetězce^[7].

Tabulka 1 Příklady potravin obsahující vitamin D ^[6]

	<i>mg/100 g</i>
olej z rybích jater	400 000
tuňák	1000
kakaové máslo	750
rybí olej	50-500
sleď	400
žloutek	8
tvrdý sýr	5
vejce celé	3
máslo	2,5
játra hovězí	2,5

2.1.2 Dávkování, příjem vitaminu D v dětském věku

Doporučené hodnoty přijímaného vitaminu D jsou pouze hodnoty, které přijímáme perorálně^[8]. Nejvhodnější příjem záleží na potravě a jejím složení, na celkovém zdravotním stavu dítěte, na roční době i jak často se dítě pohybuje venku. Zvýšená hodnota vitaminu D se bude vyskytovat u dětí, u kterých probíhá rychlý růst kostí, zejména u dětí, které mají nízkou hmotnost po porodu. I v organismu dětí se vytváří vitamin D především vystavením slunečního záření^[9].

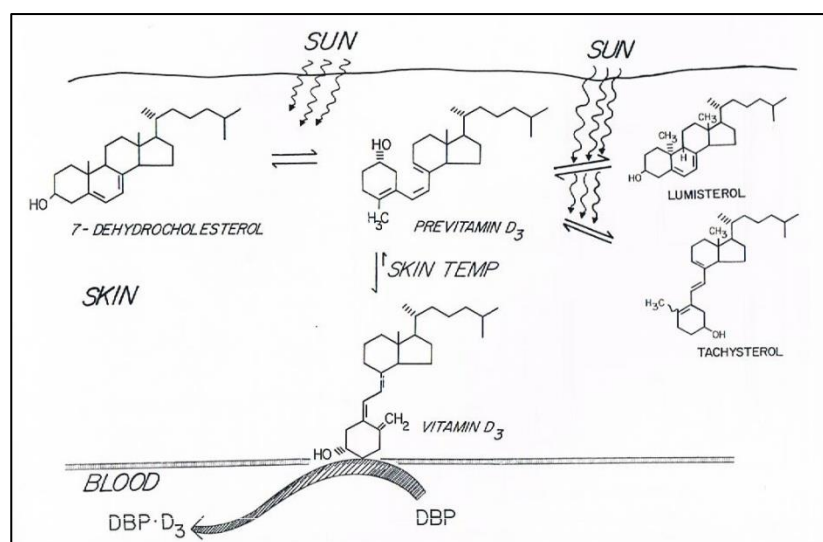
Dávka vitaminu D je v literatuře vyjádřena v mezinárodních jednotkách- IU. 1 IU = 0,25 µg. Řádný příjem vitaminu by měl být 20-25 µg = 800-1000 mezinárodních jednotek, dále jen IU, denně ^[10]. Vědci podle nových poznatků došli k závěru, že doporučená denní dávka vitaminu D by se měla pohybovat okolo 2000 IU, lépe 4000 IU, při čemž je určité množství vitaminu přijímáno slunečním zářením. 2000 IU je možno přirovnat k dávce asi 50 µg.

Jestliže matky, které kojí, nesplňují příjem okolo 6000 IU denně, je nutno doplnit kojenci 800 IU. Denní příjem vitaminu u dětí, které netráví tolik času na slunci, by tedy měl být 1000-2000 IU, v závislosti na jejich váze. Je nutné brát na vědomí škodlivé účinky vysokých dávek, což by mohlo vést ke zvýšeným hodnotám vápníku v krvi- hyperkalcémii. Spolehlivá a neškodlivá dávka je 10 000 IU- 250 µg. Tuto dávku není pravděpodobné

získat pomocí multivitaminů a suplementů. Z důvodu dřívějších obavz předávkování vitaminem se navrhli nižší hodnoty. Tableta suplementu obsahuje vitamin D pouze do 100 IU- 2 μ g^[11].

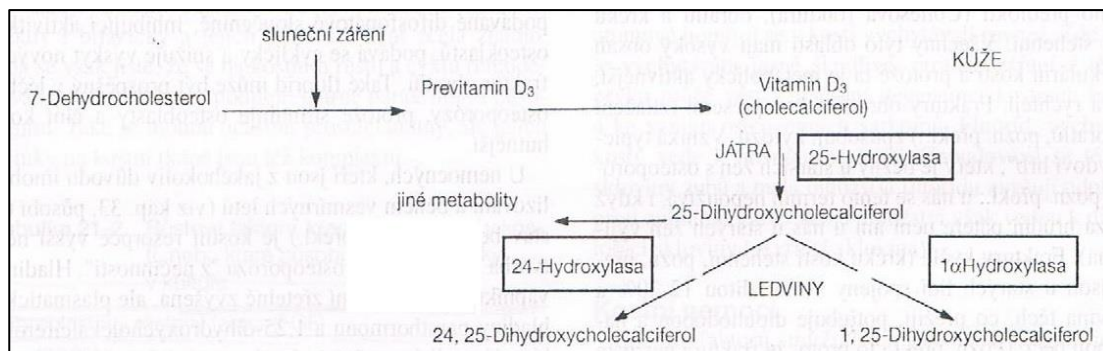
2.2 Působení vitaminu D v organismu

Po působení slunečních paprsků vzniká v kůži nejdříve provitamin D₃, který následně přestoupí na vitamin D₃, cholekalciferol. Ten, se svými hydroxylovanými deriváty, je přepravován v plasmě. Zde plní svou úlohu specifický globulin- vitamin D vážící protein, dále jen DBP, na který je vitamin D₃ připoután. Tato vazby je, oproti vazbě provitaminu D₃ s DBP, vysoká. Proto DBP přepravuje vitamin D₃ z kůže do krve ^[12].



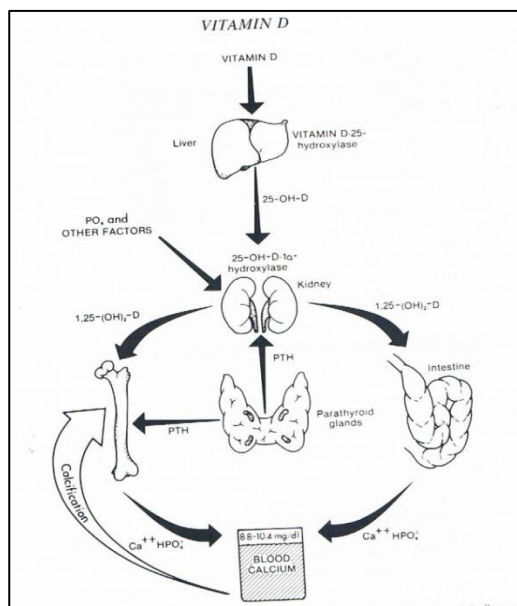
Obrázek 1 Schéma ozáření 7- dehydrocholesterolu a jeho přeměny na provitamin D₃ a následný vznik vitaminu D₃^[13]

Následně vitamin D₃ přestupuje v játrech na kalcidiol (25- hydroxycholecalciferol), dále přes tubuly ledvin na metabolit kalcitriol (1,25- dihydroxycholecalciferol), který má účinnější působení ^[12]. Stejným způsobem se v organismu přeměňuje i vitamin D₂. Je tak vytvořena aktivní látka, která se vyskytuje buď jako 1 α ,25- dihydroxycholecalciferol nebo 1 α ,25- dihydroergokalciferol^[8]. Enzym, který působí při těchto reakcích, je 1 α -hydroxylasa. Vyskytuje se v proximálních tubulech v ledvinách, ale vytváří se i v placentě, makrofázích a v buňkách pokožky- keratinocytech^[12].



Obrázek 2 Vznik a hydroxylace vitaminu D_3 ^[12]

Přeměna kalcidiolu na kalcitriol je citlivě řízena a to zpětnou vazbou s vápenatými ionty (Ca^{2+}) a fosforečnými ionty (PO_4^{3-}) v plasmě. Působením kalcitriolu ve stěně střev a v kostech se zvyšuje hladina těchto iontů. Vznik kalcitriolu je stimulován parathormonem, dále jen PTH, a jestliže se v plasmě vyskytuje nízká hladina vápenatých iontů, zvýší se vylučování PTH. Naopak pokud je vysoká hladina těchto iontů, je nízká tvorba kalcitriolu. Ledviny tak vytvářejí neúčinný 24,25-dihydroxycholecalciferol. Vznik kalcitriolu může být naopak povzbuzován nízkou plasmatickou koncentrací fosforečných iontů a utlumován může být vysokou plasmatickou koncentrací fosforečných iontů. Další řízení vzniku kalcitriolu probíhá zpomalením enzymu 1α -hydroxylasy^[12].



Obrázek 3 Schéma regulace metabolismu a funkce vitaminu D ^[13]

2.2.1 Funkce vitaminu D

Mezi hlavní funkce vitaminu D patří přijímání vápníku a fosfátu z potravy a následné zpracování těchto látek v těle. Kalcitriol, metabolit, který vzniká v játrech a ledvinách má za úkol zvyšovat vstřebávání vápníku a fosfátu ve střevě a zpětné vstřebávání těchto látek, které jsou vylučovány do moči. Pokud jsou zvýšené hladiny vápníku a fosfátu, začne se v ledvinách tvořit z kalcifediolu metabolit, který zvyšuje hladiny těchto látek méně. Tím je hladina vápníku a fosfátu zachována na standardní úrovni. Tento mechanismus je nefunkční, pokud je vitamin D trvale získáván ve vyšších dávkách, než je pro organismus potřeba^[6].

2.3 Působení vitaminu D s vápníkem

Vitaminem D₃, parathormonem a kalcitoninem je řízena hladina vápníku a jeho koncentrace ve tkáních, která je spojována s fosfáty. V metabolismu vápníku má svojí úlohu i hormon kůry nadledvin- kortizol^[14]. Zmíněné hormony působí na ledviny, kosti a tenké střevo^[15]. Vápník je potřebnou stavební součástí tkáně zubů a kostí, napomáhá svalovému stahu, je důležitý pro srdeční činnost, potřebnou složkou koagulační kaskády, účastní se aktivace enzymů a jeho zvýšená či snížená hladina se podílí na nervové vzrušivosti buněk^[2]. Vitamin D₃ zesiluje a dodává účinky parathormonu, to je důvodem, proč je aktivován v ledvinách za přítomnosti parathormonu při nízkých hladinách vápníku. Působením vitaminu D se zvyšuje vstřebávání vápníku a fosfátů ve střevě, strádání vápníku do kostí nově vytvořených a napomáhá absorpci vápníku z kostí hmoty, která se odbourává^[2]. Vitamin D reguluje výměnu vápníku navázáním se na receptor v epiteliích střeva, kde navodí syntézu proteinu, který váže vápník a je tak umožněna přeprava vápníku do intersiticia. Následkem toho je zvýšená kalcémie a vstřebávání vápníku ve střevě. Kalcitriol působí i na kost, oživením kostních buněk- osteoklastů a následnou aktivací vápníku a fosfátů. Poškození kosti nastává při zvýšené tvorbě kalcitriolu^[5].

2.3.1 Parathormon

Jedná se o peptidový hormon, který je vytvářen příštítnými tělísky, drobnými žlázkami, které se vyskytují na okrajích laloků štítné žlázy. Tento hormon má řídicí funkci u hladiny vápníku v krvi. Jestliže se má uvolňovat parathormon, určí nízká koncentrace vápníku v plazmě, který zeslabí spojitost vápníku a receptoru na povrchu žlázek a zeslabí se uvolňování hormonu^[14]. Parathormon má vliv na kosti, u kterých stimuluje vznik i zeslabení kostní tkáně. To se projeví odstraněním kalcia z kostí a zvýšení kalcémie. Dále působí na tubuly ledvin, především na zpětnou resorpci fosfátů a zvýšení opětovného vstřebávání vápenatých iontů. Působení tohoto hormonu má vliv i na tenké střevo, kde reguluje vznik kalcitriolu, a tak i vstřebávání vápenatých iontů střevní sliznicí^[15].

Poškození sekrece parathormonu se může projevit hypotyreózou, nízkou sekrecí parathormonu. Při tomto stavu se nalézá nízká hladina vápníku v plazmě a následkem toho je vyšší nervová stimulace, která se projeví zejména zvýšenou dráždivostí centrální nervové soustavy, následkem poklesu Ca^{2+} . Naopak vysoká sekrece, hypertyreóza, způsobí odbourávání kostní hmoty a ukáže se vysokou hladinou vápníku v plazmě, výskytem vápníku v moči, kde se tvoří vápenné močové kamínky, svalovou únavou i poškozením myšlení^[2].

2.3.2 Kalcitonin

Tento hormon, tvořený buňkami v štítné žláze, je nejméně významný pro regulaci metabolismu vápníku. Zvýšením hladiny Ca^{2+} dojde k produkci kalcitoninu^[15]. Ta může být podněcována glukagonem a estrogeny, to potvrzuje zvýšená produkce kalcitoninu v těhotenství. Jeho funkcí je snižovat hladinu vápníku v krvi. Z kalcitropních hormonů obsahuje pouze kalcitonin receptorové buňky na osteoklastech, buňkách, jejichž funkcí je odbourávání kostní hmoty. Jednou z nejdůležitějších funkcí tohoto hormonu je opatrovat kostní tkáň matky, před požadavky plodu v těhotenství. Ochrana kosti spočívá v zábraně kostního vstřebávání, přispívání uložení vápníku do kosti a zeslabuje působení parathormonu^[2].

2.4 Hypovitaminoza

Jako nedostatek vitamínu D v organismu můžeme označit termínem hypovitaminóza D nebo avitaminóza D, která je označována spíše pro stav úplného nedostatku vitamínu. Hypovitaminóza D má několik důvodů, mezi které patří především nevyhovující přísun nebo poškození vstřebávání vitamínu D. Poškození tvorby kalcitriolu enzymovými poruchami nebo absence receptorů pro kalcitriol. Mezi příčiny hypovitaminózy D patří i hypofosfatázie, kdy se v moči objeví fosfoetanolamin nebo je snižená koncentrace alkalických fosfatáz, dále jen ALP^[15]. Je hlavní vědět, že vitamin D se především tvoří v kůži po působení slunečních paprsků a jen 10 % je získáván z potravy. Do rizikové skupiny, které mohou, být postiženy nedostatkem vitamínu D, patří: plody *in utero*, těhotné a kojící ženy, novorozenci a kojenci, děti s rostoucím organismem, vegetariáni a vegani, pacienti s malabsorpcí, s chronickým onemocněním jater a ledvin, s nefrotickým syndromem, s dispozicí ke kostním chorobám, s opakovanými zlomeninami, s poruchami kalciumfosfátového metabolismu a lidé vyhýbající slunci^[16]. U přísných veganů, se může snadno projevit nedostatek tohoto vitamínu, jelikož nepřijímají živočišné výrobky (mléko, vejce), které jsou zdrojem vitamínu D^[6]. Pokud nemá organismus matky během těhotenství dostatečné množství vitamínu D, nemá žádné zásoby vitamínu ani novorozenec, během prvních měsíců života.

Nedostatek vitamínu D se vyskytuje v zemích Středního Východu, kde chodí zdejší ženy zahaleny. Také děti tmavší pleti jsou považovány za skupinu s nízkou hladinou vitamínu D, jelikož jsou plně kojeny a nepřijímají tak doplňující vitamin D^[17]. Při nedostatečném příjmu vitamínu D je v ledvinách snižená produkce kalcitriolu. V souladu s omezenou tvorbou kalcitriolu, klesá vstřebávání vápníku, což tělu nabízí menší nabídku minerálů pro skelet.

Důsledkem toho jsou poruchy chrupavky a osifikace okostice s poruchou ukládání vápenatých solí do tkání růstových štěrbin. Kvůli vyšší činnosti kostních buněk, osteoblastů, nastává zmnožení buněk a tkání nekalcifikovaných osteoidů (kostních tkání, které nejsou zvápenatěny) s kostními výrůstky. Pokud je příjem vitamínu D i nadále nevyhovující, dochází k přerušení vstřebávání vápníku ve střevech a následkem toho nastává snižená hladina vápníku v krvi. Dále se vyvíjí nadměrná sekrece

parathormonu, dochází k zadržení růstu, přetvoření kostí a vznikají patologické zlomeniny^[18].

2.4.1 Vitamin D a diabetes mellitus

U lidí žijících v zemích, které leží dál od rovníku, je v Evropě a USA, častější nález diabetu typu I., stejně tak roztroušené sklerózy nebo revmatoidní artritidy. Uvedl to výzkum, který se věnuje souvislostem mezi zeměpisnou šířkou, klimatem a autoimunitními onemocněním. Výsledky fotoimunologických výzkumů potvrdili i vztah mezi UV radiací a množstvím vitaminu D.

Pokud se vyskytuje malé množství vitaminu D u dětí v prvních měsících života spolu s polymorfismem genu pro receptor vitaminu D, dále jen VDR, je to považováno za rizikový faktor pro vznik diabetu 1. typu. Toto je objasněno mechanismem potlačení cytokinů a působením činností T-lymfocytů. Je více důležitá suplementace vitaminu D v prenatálním vývoji, než po narození, v souvislosti s případným vznikem nebo s prevencí diabetu 1. typu. Spojitost vitaminu D a diabetu vychází z výskytu 1 α -hydroxylasy v buňkách pankreatu. Více objasněna je souvislost kalcitriolu a diabetu 2. typu. Nízká koncentrace vitaminu D je propojena s poškozenou funkcí beta-buněk pankreatu a s inzulinovou rezistencí.

Podle výsledků studií se malé množství kalcidiolu objevuje u 70 % diabetiků 2. typu. Po podávání vitaminu D₃, v období 1 měsíce, se koncentrace kalcidiolu ustálí, nastane pokles inzulinové rezistence a dojde ke zvýšení 1. fáze vylučování inzulinu při intravenózním glukózovém tolerančním testu. Nízký příjem kalcitriolu v prenatálním období může vést k nízké hmotnosti novorozence po porodu a k nastavení činnosti beta-buněk pankreatu^[4].

2.4.2 Vitamin D a imunitní systém

Postihuje imunitní systém v několika rovinách, a to snížením aktivity růstu T-lymfocytů, tím že potlačí G-fázi buněčného cyklu a nedá možnost vzniku cytosinům^[16]. Vztah mezi vitaminem D a imunitním systémem je spojován s rčením: „*Kam nechodí slunce, tam chodí lékař.*“ Receptorem pro vitamin D a 1 α -hydroxylasou jsou vybaveny buňky přirozené imunity, kam patří zejména dendritické buňky a makrofágy, které mají funkci v představení

antigenu, při fagocytóze a při poznávání patogenů spojené s mikrobi. Dále se mezi ně řadí kmenové buňky brzlíku a některé druhy T a B lymfocytů ^[19]. Pokud dojde ke spojení kalcitriolu s VDR, receptorem pro vitamin D, je tak omezena exprese MHC molekul II. třídy, jejichž funkce je představení antigenu T lymfocytům.

Působením kalcitriolu je odpověď pomocných lymfocytů, které se podílejí na buněčné imunitě, zeslabena, jelikož jeho účinkem nevznikají cílové cytokiny. Na rozdíl od odpovědi pomocných buněk v humorální imunitě, která je podpořena působením kalcitriolu.^[20]

2.5 Křivice (Rachitis)

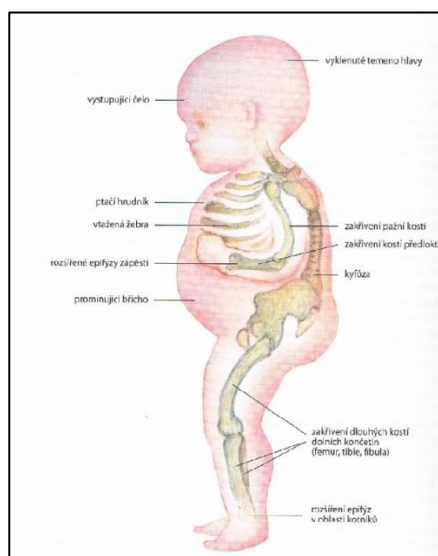
Rachitida se vyskytovala spíše v 18. a 19. století, během průmyslové revoluce. Objevují se záznamy, které říkají, že roku 1889 byly v Bostonu přijaty děti mezi prvním a druhým rokem, kde se u čtyř pětín z těchto dětí objevovaly známky rachitidy. Až do doby roku 1940 byla tato nemoc určena jako nejfrekventovanější dětská choroba. Se započatím suplementace vitaminu D, okolo roku 1960, se značně snížila přítomnost této choroby a doposud je označována jako vzácná. V posledních dvou desetiletích se objevuje křivice v Africe a tropických částech Asie, kde je nejpodstatnějším důvodem nízký přísun vápníku. V Evropě a Spojených státech jsou ojedinělé stavy nedostatku vitaminu D a nedostatečný příjem vápníku, především batolecím období dítěte^[10].

Toto onemocnění se nazývá „andělská nemoc“, a to proto, že postižené děti mají vystouplé lopatky^[14]. Vzniká z nedostatečného přísunu vitaminu D a týká se především dětského organismu, který je ve fázi vývoje. Vyskytuje se hlavně v prvním až druhém roce a působí zejména na kostní systém, v místech, kde je nedostačující uložení vápenatých solí do kostní tkáně, která je nově vytvořená.

Klinické známky tohoto onemocnění jsou nejčastěji patrné na kostech, kde se projevují změknutím lebečních kostí na záhlaví (kranioabes), zduřením zápěstí a rachitickým růžencem. Dále radiologické známky, kde nacházíme pohárkovité zakončení diafýz. Mohou se vyskytovat i biochemické známky, které se projevují sníženou koncentrací anorganického P nebo zvýšením aktivity ALP v séru^[9].

Vlivem rachitidy se mohou objevovat respirační onemocnění- bronchitidy, bronchopneumonie. Vážné výchylky od normálu u hrudníku, mohou způsobit nevzdušnost

části plíce- atelektázy. Rachitida spojená s nesprávnou výživou je obvykle spjatá s výskytem malého množství železa v krvi, dochází tedy k anémii [18].



Obrázek 4 Příznaky popsané na dítěti s křivicí [18]

2.5.1 Souhrn příznaků charakterizující rachitidu

První charakteristické známky se mohou projevit na dětské nervové soustavě. Děti mají problém se spánkem, nevydrží být v klidu, často se potí na záhlaví. Současně se u nemocných vyskytuje větší sklon k respiračním infekcím^[9]. Mezi hlavní příznaky patří kostní deformace, náchylnost ke zlomeninám, svalové slabosti a defekty růstu. U dětí převažují psychické výkyvy, vysoká dráždivost a velké svalové slabosti. Rachitis se nejčastěji projeví kolem třetího měsíce života a nejvíce se objevuje v druhé polovině prvního roku života. Toto onemocnění je pro starší děti ojedinělé a spíše se u nich nevyskytuje.



Obrázek 5 Typicky vypadající děti s křivicí. Dítě uprostřed je v normálu, bez onemocnění. U dětí na kraji se vyskytují projevy křivice svalovou slabostí a kostní deformací- zakřivené nohy (vpravo), vylomená kolena (vlevo) ^[21]

Vyskytují se různé formy křivice se shodnými kostními změnami. Mezi formy toho onemocnění patří: nutriční rachitida, hypofosfatemická forma, renální rachitida, Fanconiho rachitida a rachitida přiceliakii. U všech typů onemocnění se na rentgenovém snímku vyskytuje křehkost kostí, zvětšené koncové části dlouhých kostí (epifýz) a jejich zpožděný vývoj a rozšířené růstové ploténky. Jednotlivé typy onemocnění se liší laboratorními a klinickými přeměnami^[22].

U nutriční formy rachitidy se laboratorní změny projeví normální koncentrací vápníku v séru, sníženou koncentrací fosforu a moč zcela v normálu. Tato forma je u nás neobvyklá a dětem s touto formou onemocnění je přiváděna zásoba vitamínu D v dostatečném množství. Vyskytují se chorobné změny na bércích, jsou rotované a vybočené. Dále se projevuje rozšířenými zápěstími a změnami na hrudníku, na kterém dojde ke zvětšení spojů v žebrech mezi chrupavkami. Tyto změny můžeme pozorovat na rentgenovém snímku. Léčba závisí na podaných dávkách vitamínu D a to 125 µg denně. Chorobné změny se uzdravují pomaleji. Po zjištění výskytu tohoto onemocnění nutné se zdržovat zátěží na dolní končetiny ^[22]. Renální rachitida je spojena s problematikou ledvin. Ať už je tato forma získaná či vrozená, její odhad pro další vývoj není dobrá. Terapie operací se vyskytuje

pouze málokdy. Podobně to vypadá s Fanconiho rachitido. U rachitidy při celiakii je příznivou léčbou vhodné dodržování stravy, kde je větší přísun vápníku a vitamínu D ^[22].

2.5.2 Laboratorní vyšetření

Podle fáze onemocnění mohou být hodnoty vápníku a fosfátu standardní a tudíž nemají příliš velký diagnostický význam. Hodnoty kalcitriolu se mohou i zvyšovat. Trvalým projevem tohoto onemocnění je zvýšená plazmatická koncentrace parathormonu a aktivita alkalické fosfatázy. Pokud má praktický lékař pro děti a mládež obavy pro nález deficitní křivice, je důležité vykonat určité vyšetření^[17].

Jako první je nutné provést odběr krve, pro určení hodnot kalcia, fosforu, hořčíku, močoviny, kreatininu, celkové aktivity alkalické fosfatázy a jaterních testů spolu s gama-glutamyltransferázy. Pokud jsou hodnoty gama-glutamyltransferázy v normálu vylučuje se tak výskyt cholestázy a možná zvýšená aktivita alkalické fosfatázy je vyvolaná kostním isoenzymem. Jelikož je vyšetření kostních isoenzymů ekonomicky nákladné, není nutné ho obvykle provádět^[17].

Výstižné změny bývají u biochemického vyšetření séra, kde jsou hodnoty vápníku v normálu nebo lehce snižené a hodnoty anorganického fosforu jsou znatelně nízké. Standardní hodnota fosforu v séru je 1,29-2,26 mmol/l, snižené hodnoty u křivice bývají 0,65-0,97 mmol/l. Zásadní je určení hodnoty alkalické fosfatázy, u nichž se zvyšuje hodnota ze standardních 2-12 nkat/l na 6-36 nkat/l. Jsou to hodnoty, které nám ukazují výskyt, ale i hojení onemocnění křivice ^[4]. Mezi další vyšetření patří vyšetření moči a sedimentu, kde se sleduje vylučování fosforu a vápníku do moči za 24 hodin^[17].

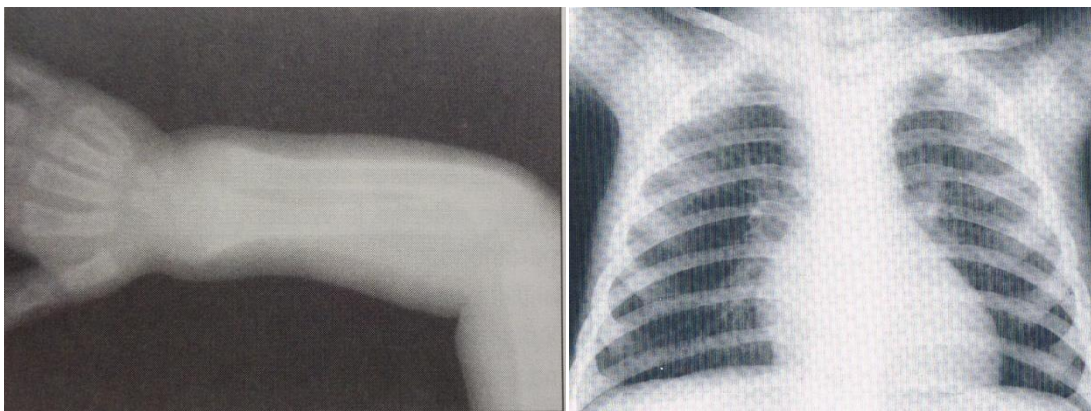
2.5.3 Rentgenové vyšetření

Rentgenový snímek spolu s hodnotami celkové aktivity alkalické fosfatázy jsou zásadní diagnostickou známkou tohoto onemocnění. Pokud se onemocnění vyvíjí standardním postupem, není potřeba zjišťovat hladiny metabolitů vitamínu D a parathormonu^[17]. Pro stanovení tohoto onemocnění a pro sledování jeho vývoje a hojení jsou rentgenové snímky důležitou částí vyšetření. Nejvíce znatelné rentgenové nálezy jsou na distálních koncích kostí u předloktí. Za normálních okolností jsou rentgenové snímky konce dlouhé kosti ostré a přesně ohraničené. U křivice se vyskytuje zóna provizorního zvápenatění,

u které jsou konce dlouhé kosti neostré, smazané a vyhloubeně prohnuté.

Následně se změny vyskytnou i v metafýze a diafýze. Štěrbina u zakončení dlouhé kosti je rozšířená a ohraničení jader je neostré. Jádra epifýzy mohou u těžších případů vymizet. Na diafýzách kostí u předloktí, na žebrech nebo na postranním okraji lopatky se vyskytují Looserovy zóny, což je proužkovité projasnění, které vzniká tvorbou kostní tkáně a ztrátou vápníku^[9]. Mezi další příznaky a známky průběhy nemoci, které se projeví na skeletu dítěte, jsou:

- Kraniotables: změknutí záhlaví, opožděný uzávěr vazivového spojení na hlavě novorozence, tzv. velká fontanela.
- Caput quadratum: oploštění zadní části lebky, vyklenutí přední části lebky.
- Rachitický růženec: zvýšená tvorba osteoidu v přechodné části chrupavčité a kostěné části žeber (obr. 6).
- Harrisonova rýha: vtažení hrudníku a rýha, vyskytující se v oblasti bránice (obr. 7).
- „Žabí břicho“ : snížené napětí břišní svaloviny (obr. 7).
- Kyfóza při sedu: zakřivená páteř při dosedu, příčinou jsou ochablé svaly a vazy.
- Marfanovo znamení: zduřené konce kostí, které je dáno zmnožením osteoidu.
- Pectuscarinatum: vyklenutí hrudní kosti a oploštění na straně hrudníku.
- Kloubní změny: přetvoření a zúžení pánevního vchodu, vbočená a vybočená kolena (genuavalga, genuavara) ^[18].



Obrázek 6 Vlevo- snímek horní končetiny při rentgenovém vyšetření- rozvláknění rozšířených metafýz dlouhých kostí- rachitické pohárky^[17]

Obrázek 7 Vpravo- typický rachitický růženec (rozšířené zakončení žeber) u rentgenového snímku 4letého chlapce s křivicí^[13]



Obrázek 8 Vlevo- snímek sedmiměsíčního chlapce s křivicí. Úplná absence zkostnatění dolní a horní části stehenní kosti a horní části holenní kosti^[13]

Obrázek 9 Vpravo- typická Harrisonova rýha a žabí břicho^[18]

2.6 Léčba deficitní křivice

Terapie je založena na upravené stravě a především příjmu vitamínu D. Pokud je chybná strava, snažíme se odstranit chyby tak, aby dítě přijímalo plnohodnotnou stravu, která je přiměřená věku dítěte. Přívod vitamínu D lze podávat intramuskulárně, per os v podobě tobolek či kapek nebo injekčně.

2.6.1 Dávkování vitamínu D perorálně

Dávka pro léčbu je 0,125-0,375 mg vitamínu D denně. Po větších dávkách nebo po dávkách které se užívají nárazově, nastanou pokroky léčby rychleji. V podobě tobolek se nárazově podává vitamin D, v dávkách až 7,5 mg, u těžkých případů křivice. Tuto dávku lze znovu podat za 3-4 týdny. U těchto případů se látka podává jako tobolka, lžičkou na jazyk v době jídla. Po podání takto podané látky se mohou po 2 dnech objevit první známky léčby, snížení hodnot alkalických fosfatáz, lepší klinický projev a následně i změny na rentgenovém snímku^[9].

2.6.2 Dávkování vitamínu D muskulárně

Mezi další způsob léčby patří vpravení vitamínu D do svalu v podobě vitamínu D₃. V dnešní době je možné použít prostředek v této podobě- Vigantol 50000. 1 ml tohoto prostředku je 1,25 mg = 50 000 IU vitamínu D₃. Dávka, která se běžně používá, je 1 ampule podaná intramuskulárně. Takto podaná látka se uskladní do tukových a svalových buněk a její přestup na kalcitriol probíhá během několika týdnů. Množství podané látky závisí na nezbytnosti vitamínu D, dávku je možné poskytnout 2-3x v období 3-4 týdnů. V době léčby křivice je nezbytný příjem vápníku.

Z hlediska farmakologického podávání vápníku se používá v podobě citrátu nebo karbonátu, spolu s jídlem a denně ve větším množství dávek. Správnou léčbou se ke správné hladině vápníku a sloučenin kyseliny fosforečné v krvi docílí rychle. Do týdne by se mělo docílit snížené aktivity alkalické fosfatázy. Hladiny těchto ukazatelů by se měli kontrolovat 2x-3x týdně, dokud nedojde k normálu. Rentgenový snímek zápěstí je nejvhodnější porovnat za 6-8 týdnů, aby byly patrné změny^[17]. U nedonošených dětí se léčba provádí nárazovými dávkami. Vitamin D ve formě injekce se podává, pokud postižený trpí špatným vstřebáváním tuků. Pokud se vyskytují těžké formy rachitidy, doporučuje se brát perorálně i vápník, současně s dávkou vitamínu D^[9].

2.7 Prevence

Nejvíce se využívá vitaminu D₃, jako předcházení deficitní křivice. Vhodná je kapková forma této látky, která se podává per os. V období gravidity má plod příjem vitaminu D přes placentu. Pro matky je doporučován příjem 400 IU vitaminu D každý den, po celou dobu gravidity nebo příjem 1000 IU (25 µg) každý den v období třetího trimestru. Nikdy není zcela jisté, jakým množstvím vitaminu D je narozené dítě zásobeno, proto je vhodná suplementace vitaminu D pro všechny děti. V České republice se podává zhruba 600-800 IU vitaminu D.

Suplementace se postupně posuzuje s ohledem na četnost vitaminu D v daném přípravku, aby se dávka která je přijímána každý den rovnala výši uvedeného množství. Příjem vitaminu D by měl být u dětí po celé kojenecké období. Děti v batolecím období a starší děti by měly mít příjem stejné dávky vitaminu D, především během zimních měsíců.

K prevenci patří i příjem vápníku, který se získává z mléka a z mléčných výrobků. Denní příjem vápníku u dětí do 6 měsíců měl být 400 mg denně. Postupně je potřebný přívod vápníku navyšován se zvyšujícím se věkem dítěte. Potřebná dávka vápníku u dětí v druhém půlroce života je 600 mg, v předškolním věku 800 mg, u mladšího školního věku je to 800- 1200 mg a u dospívajícího organismu je vhodná dávka vápníku kolem 1200-1500 mg denně ^[17].

2.8 Dědičné poruchy metabolismu vitaminu D

K postižení, které souvisí s přítomností vitaminu D v organismu, může dojít i geneticky. To se projeví již na začátku života. Poruchy děděných chorob mají často příznaky stejné jako příznaky, které se objevují u křivice z nedostatku vitaminu. Při těchto poruchách dochází k poškození některého metabolitu či receptoru, které se podílejí na metabolismu vitaminu D a jeho působení v organismu. Mezi tyto dědičné poruchy se řadí především:

- Vitamin D- dependentní rachitida typu I
- Vitamin D- dependentní rachitida typu II
- Familiární hypofosfatemická vitamin D- rezistentní rachitida

2.8.1 Vitamin D- dependentní rachitida typu I

Tento typ onemocnění, VDDR I, se dědí autozomálně recesivně. Projevuje se omezenou syntézou nejúčinnějšího metabolitu vitamínu D, kalcitriolu. Dojde k tomu poškozením enzymu 1 α - hydroxalasy. Laboratorní vyšetření a rentgenový snímek se jeví stejně, jako u rachitidy z nedostatku vitamínu D. Tento typ rachitidy lze diagnostikovat laboratorním vyšetřením, u kterého se projeví:

- snížená hladina kalcitriolu v séru
- normální hladina kalcidiolu v séru
- snížená koncentrace vápníku a fosforu
- zvýšená koncentrace PTH v séru.

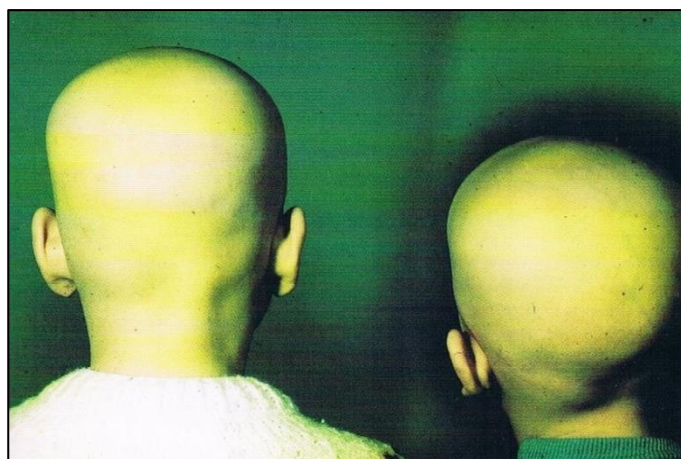
Při léčbě tohoto typu onemocnění je důležité nahradit odolnost vůči vitamínu D, kalcitriolem, jehož dávka je 1-2 μg denně. Je zároveň důležité mít dostatečný příjem vápníku v potravě^[18].

2.8.2 Vitamin D- dependentní rachitida typu II

Tento typ rachitidy, VDDR II, který se vyznačuje poškozením receptoru pro $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ je autozomálně recesivní onemocnění. Postižení jedinci mají nejvyšší hodnoty $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$. Takto zvýšené hladiny v séru jsou důsledkem působení tří závažných stavů v ledvině, a to je zvýšená hladina vápníku, snížená tvorba hormonů štítné žlázy a zvýšená hladina fosfátů v krvi ^[7].

Klinický průběh se projeví zejména kožními změnami a častou alopecií. Mezi hlavní projevy patří malý vzrůst a těžká rachitida s nedostatkem vápníku. Léčba se provádí přísunem kalcitriolu v množství 50 μg denně, nebo vysokými dávkami vitamínu D. Pokud tato léčba nebude účinná, podává se vápník ve vysokých dávkách ^[18].

Pokud nejsou nemocní jedinci léčeni, trpí celkovým vysílením, vyhubnutím, těžkými kostními změnami a infekcemi dýchacího ústrojí, které se neustále vracejí. Postižení se přibližně dožívají 8 let života ^[7].



Obrázek 10 Dvojčata s vitamin D- dependentní rachitidou typu II, projevující se typickou alopecií, která se rozvinula během 1 roku života ^[22]

2.8.3 Familiární hypofosfatemická vitamin D- rezistentní rachitida

Je to onemocnění vázané na X chromozomy, u kterého se projevuje dominantně dědičné poškození zpětného vstřebávání fosfátů v proximálních tubulech ledvin a současně tak velkou ztrátou fosfátů močí. Dochází při něm k poškození přeměny kalcidiolu na kalcitriol^[14]. Mutovaný gen je umístěn na distální části krátkého raménka chromozomu X. Tento typ onemocnění se tedy nepřenáší z otce na syna a postihuje až dvakrát více ženy. U žen je projev této choroby menší ^[7]. Projeví se až po nějaké fyzické zátěži, zejména při chůzi, tedy kolem 1. roku života a to těžkou pozdní formou rachitidy, která se vyznačuje silnou deformací dolních končetin. Dále také dochází k poruše růstu, což vede k malé postavě postiženého ^[18].

Diagnosticky je toto onemocnění označováno nálezem hypofosfatémie pod 0,8 mmol/l, snížením vylučování fosfátů močí, omezením vylučování vápníku, normální hladiny PTH a normální nebo lehce snížené koncentrace $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Léčba je založena na podávání 2,5 μg kalcitriolu a 1-4 g fosfátu denně. Fosfát musí být dáván postiženému v několika dávkách za den, nejlépe 5krát denně ^[7].

2.9 Hypervitaminóza D

Termínem hypervitaminóza je označován vysoký přísun vitamínu. Pokud je vysoký přísun vitamínu D, na organismus působí toxicky. Vyšší všímavost se musí dávat při chorobách ledvin, při zvýšené tvorbě hormonů štítné žlázy a při špatném průběhu růstu.

Toxická hladina vitamínu D se vyskytuje při stálém, dlouhodobém užívání 0,7 - 7,5 mg denně ^[9]. Pro adolescenty je, podle experimentálních studií, dávka až 2000 IU bezpečná. Po nadměrném vystavení se slunečním paprskům by nemělo dojít k intoxikaci vitamínem D, protože nadměrné množství metabolitů, které vznikají v kůži po působení slunečních paprsků (provitamin D₃ a vitamin D₃), se v kůži následně i rozpadne na mnoho nevápenatých produktů. Z dermatologického hlediska je to ale nebezpečné a nedoporučované ^[10]. Otrava vitamínem D může nastat pouze při vysokém příjmu potravy či suplementací. U dětí mohou nastat známky otravy i při nízkém předávkování vitamínem D během prevence rachitidy ^[23].

2.9.1 Projevy otravy a terapie

Pokud dojde k předávkování organismu, objevují se jednotlivé příznaky, které se začínají projevovat za 1-3 měsíce. Mezi základní diagnostické známky otravy patří: anorexie, zvracení, hypertenze, bledost. Zvyšuje se hladina vápníku, nebílkovinného dusíku a vylučování vápníku močí. Z moči se vylučují bílkoviny a můžou se vyskytovat cylindrické válce (cylindrurie) ^[9]. U akutní hypervitaminózy D se ukládají vápenaté soli do stěny cév a ledvin. Vápník unikl z kostí, ve kterých dochází k úbytku vápenatých solí.

Většinou se hypervitaminóza neprojeví zvýšeným příjmem vitamínu z potravy, pouze jde-li o potraviny, které jsou uměle upravovány přidáním vitaminů ^[5]. Léčba probíhá zanedbáním příjmu vitamínu D a vápníku. ^[9].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je podat ucelený přehled o významu vitamínu D v organismu, jeho působení, metabolismu a získávání ze slunečního záření nebo přísunem vhodné potravy. Rešerší popsat současný stav problematiky, se zaměřením na výskyt vitamínu D u dětí, jaké následky nastanou při nedostatečném příjmu tohoto vitamínu. Popis onemocnění křivice postihující skelet dítěte při nízkém příjmu vitamínu D.

Cílem praktické části je popsat principy a metody pro stanovení metabolitu vitamínu D, 25-hydroxyvitamin D, které se dnes využívají, pro zhodnocení hladiny vitamínu D. Dále popsat přístroj Cobas e411 od firmy Roche, na kterém byla změřena data pacientů využitá ke statistickému zpracování v praktické části a ze souboru dat vybrat pacienty mladší 15 let a jejich hodnoty hladiny vitamínu D graficky a statisticky zpracovat.

4 METODIKA

Nejlepším ukazatelem stavu vitamínu D je 25-hydroxyvitamin D, dále jen 25(OH)D. Na začátku 70. let byly objasněny první metody měření hodnot 25(OH)D, které vznikly na základě vazby s proteiny. V prvních pokusných testech byl vazebným činidlem vazebný protein vitamínu D ze séra potkanů s nízkou hladinou vitamínu D. V druhé polovině 70. let se objevily metody spojené s vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií, dále jen HPLC. Další metoda vznikla v roce 1985 a to radioimunoanalýza, dále jen RIA. Kvůli nebezpečí radioaktivity se nyní spíše využívají metody založené na imunologických reakcích, a to enzymová imunoanalýza (ELISA) nebo chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA). Od roku 2004 došlo k zavedení metody spojené s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS^[25].

4.1 Chromatografické metody

Chromatografie je analytická metoda, při které dochází k selektivnímu oddělování zkoumaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Děj je založen na základě sorpčních, rozpouštěcích a iontové výměnných rovnováh. Kvantitativní analýzu a hodnocení je možné měřit až po přidání detekčního zařízení a výpočetní techniky. Mobilní fáze proudí spolu se vzorkem prostorem, který je vyplněn stacionární fází. Během proudění dochází k neustálému působení obou fází mezi sebou.

Určení stanovované látky je dáno celkovým časem jejího průtoku kolonou, což je poloha detekovaného píku (vrcholu) v časové ose. Tento retenční čas je pro každou látku daný. Koncentrace dané látky je vyjádřena plochou a výškou píku. Chromatografie se odlišuje podle nosného média na plynovou a kapalinovou^[26].

V současné době se používají dvě metody, které nejsou založené na imunologické reakci. U všech chromatografických metod vystupuje odděleně 25(OH)D₂ a 25(OH)D₃. Z klinického pohledu se upřednostňuje výsledek vyhodnotit jako součet jejich koncentrací.^[25]

4.1.1 Hmotnostní spektrometrie

Tato metoda je vhodná pro získání chemické struktury analytů, které se vyskytují v biologické matrici. Analyt, který chceme určit, musí být převeden do ionizovaného stavu a následně je proud iontů, které jsou rozděleny hmotnostním separátorem, směřován na detektor. Množství dopadajících iontů je pomocí softwaru upraveno do hmotnostních spekter.

Základním krokem této metody je ionizace látek. Informace, které získáme, zahrnují pouze nabitě částice- ionty. Je možné využít kombinaci kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, dále jen LC-MS. Takto kombinovaná metoda je vhodná pro analýzu kapalných směsí, i pro testování v klinické praxi ^[26]. LC-MS technologie je přístrojově dražší.

Pro měření hladiny vitamínu D se provádí APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) nebo technologická metoda založená na principu elektrospreje pro ionizaci molekul. Při této metodě se využívá postup, nazývaný izotopová diluce (ID). Metoda pro stanovení hladin 25(OH)D se s tímto postupem nazývá ID-LC-MS. V současnosti jsou využívány komerční soupravy pro stanovení 25(OH)D tímto postupem ^[25].

4.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC, (High- Performance Liquid Chromatography) je založena na chromatografické separaci s následnou detekcí metabolitů vitamínu D ^[26]. U této metody je důležité vhodně zvolit mobilní fázi. Separační kolona je vyplněna oxidem křemičitým, který bývá uzpůsoben napojením vhodných funkčních skupin. Průtok kapaliny separační kolonou je popoháněn vysokým tlakem ^[26]. Pro detekci separovaných látek může být použita hmotnostní spektrometrie, ultrafialová detekce (absorbance při 264 nm) nebo elektrochemická detekce.

Před provedením chromatografické analýzy se musí uskutečnit deproteinační a extrakční část, která může být založena na rozdělení mezi dvě rozpouštědla (liquid/liquid extrakce) nebo na extrakci na pevné fázi, dále jen SPE (solid phase extraction), při které se odstraňují lipidy. Deproteinační krok se provádí silnější kyselinou nebo zásadou a na extrakční krok se používá acetonitril, hexan, metanol nebo benzen.

Při extrakční části metody dohází k částečnému vymizení analytu, které je napraveno využitím interního standardu, což bývá látka podobná analytu svou strukturou. Nevýhodou HPLC metody je využití velkého množství materiálu a její provedení vyžaduje větší pracnost ^[25].

4.2 Imunologické metody

Tyto metody jsou založené na typické reakci antigen-protilátka a dělí z několika hledisek.

- Kompetitivní stanovení: u kterého probíhá soutěž mezi antigenem ze vzorku a stejným, značeným antigenem ze soupravy s omezeným množstvím protilátky. Výsledkem je typická kalibrační křivka podobná hyperbole.
- Nekompetitivní stanovení: probíhá vychytáváním antigenu ze vzorku mezi dvě protilátky, které jsou obsaženy v reakční směsi v přebytném množství. Výsledná kalibrační křivka má podobu paraboly.

Dále můžeme imunologické metody dělit podle používané značky a měřeného signálu. Pro stanovení dostatečného množství vitamínu D v organismu to jsou:

- radioimunoanalýza,
- enzymoimunoanalýza,
- luminiscenční imunoanalýza^[26].

Existuje mnoho souprav pro stanovení vitamínu D, radioimunoanalytické soupravy, chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční automatizované soupravy. Výhodou u imunoanalytických metod je v této moderní době nemuset provádět předanalytické extrakce ze séra, čímž se ušetří mnoho času. Vitamin D je ze séra vytažen automaticky v přístroji před stanovením a to změnou pH vzorku. Imunoanalytické metody můžeme rozdělit i podle toho, zda zachycují 25(OH)D₂. Tyto metodiky zachycují kompletně 25(OH)D₃, ale odlišují se podle procentuálního zachytu 25(OH)D₂^[25].

4.2.1 Radioimunoanalýza

Jedná se o nejstarší citlivou imunoanalytickou metodu, která jako značku využívá ^{125}I . Tento γ -zářič má poločas rozpadu 60 dní. Svoji náročností na ruční práci vyžaduje zkušenost laborantek. Negativní vlastnost této metody je její práce s radioaktivitou ^[26]. Souprava ^{125}I RIA, která je určená ke kvantitativnímu stanovení 1,25- dihydroxyvitaminu D je kompetitivní rovnovážná radioimunoanalýza, která je založena na dvoustupňovém postupu. Test obsahuje dělení a čištění metabolitů vitaminu D ze séra nebo plazmy EDTA.

Následuje metoda RIA, která se provádí na základě polyklonálních protilátek, které jsou specifické pro 1,25-(OH) $_2$ D $_2$ i pro 1,25-(OH) $_2$ D $_3$. Nejprve dochází k inkubaci vzorku, protilátek i izotopového indikátoru po dobu 2 hodin při 20-25 °C. Po 20 minutách při stejné teplotě inkubace dojde k oddělování fází precipitační složkou, čímž je druhá protilátka. Po následné centrifugaci se detektorem gama záření zhodnotí vázaná frakce v tabletě. Z výsledné kalibrační křivky známých koncentrací se zhodnotí vyměřené data. Výsledná koncentrace 1,25-(OH) $_2$ D je vyjádřena v jednotkách pg/ml ^[27].

4.2.2 Enzymová imunoanalýza

Značkou pro tuto metodu je enzym, nejčastěji se v heterogenní enzymoimunanalýze využívá peroxidasa, ALP a β - galaktosa. Produkt konečné enzymatické reakce bývá nejčastěji barevný produkt. Využívá se i měření fluorescence nebo chemiluminiscence. Často využívané stanovení, které není těžké na provedení a nenáročné na techniku je ELISA (Enzyme- LinkedImmunoSorbentAssay) ^[26].

4.2.3 Luminiscenční imunoanalýza

Luminiscence je proces vydávání světla látkou ^[28]. Výhodou této metody je nepoužití radioaktivity. Je to vysoce citlivá metoda, která se využívá v mnoha analyzátoch pro měření většího množství vzorků. Nevýhodou při zakládání metod chemiluminiscenční detekce je její náročnost na čas, finance i zkušenosti s obsluhou analyzátoru ^[26].

- Chemiluminiscence je proces, ke kterému dochází, pokud při chemické reakci vznikají elektronově excitované látky. Vzniklé excitované látky vyzařují fotony, kvůli dosažení základního stavu ^[28]. Automatické metody chemiluminiscence jsou vždy kompetitivní metody, u kterých dochází ke kompetici o vazebné místo mezi značenými látkami ^[26].
- Elektrochemiluminiscence je proces, při kterém dochází k chemiluminiscenční emisi fotonů, které jsou měřeny fotonásobičem. Emise fotonů vzniká na povrchu elektrody přivedeným napětím ^[29].

4.3 Postup stanovení 25(OH)D

Vzorky pro stanovení 25(OH)D se získávají standardní odběrovou soupravou nebo se separačním gelem. Jsou to Li-heparin, K₂- a K₃-EDTA i zkumavky s Li-heparin, které zahrnují separační gel. 25-OH (D) je stálý při 18-25 °C po dobu 8 hodin, při 2-8 °C po dobu 4 dnů a při -20 °C může být stabilní až 24 týdnů ^[29]. Jeho velká stabilita při pokojové teplotě, stálost při transportu vzorků i vůči světelnému svitu, odolnost při opakovaném rozmrazení a zamrazení má dobrý vliv na preanalytickou fázi.

Podle literatury Wienders a Wijnberg, lze o tomto analytu říci, že je pevný jako skála („*as solid as rock*“)^[30]. Před stanovením a vložením do analyzátoru by měly být zkontrolovány vzorky, kalibrátory a kontroly na teplotu 20- 25 °C. Měření by mělo probíhat po dobu 2 hodin, při ohledu na možné odpařování roztoků ^[29]. Důležitá je postanalytická fáze, kde je vhodné vědět, zda probíhá měření 25-OH vitaminu D₃ nebo měření směsi vitaminu D₂ a D₃, u které je daný poměr obou koncentrací ^[30].

4.3.1 Imunoanalyzátor Cobas e 411

Stanovení celkového 25(OH)D v lidském séru a plazmě, pro zjištění dostatečného množství vitaminu D v organismu, se provádí elektrochemiluminiscenční metodou, například na imunoanalyzátorech Elecsys a Cobas e411 firmy Roche, na kterém byly naměřeny hodnoty, které jsou v této práci statisticky vyhodnoceny ^[29].



Obrázek 11 Analyzátor Cobas e411 od firmy Roche^[31]

4.3.2 Princip testu na imunoanalyzátoru

Stanovení hodnot je kompetitivní a celková doba měření je 27 minut. Mezi první kroky stanovení patří inkubace. Jako první se inkubuje 15 μ l vzorku s přípravnou reagentií 1 a 2 je vázaný vitamin D (25-OH), který je uvolněn z vitamin D vázícího proteinu.

Druhou inkubací předpřipraveného vzorku, vitamin D vázícího proteinu, který je značený rutheniem, se vytvoří komplex vitaminu D (25-OH) a značeného vitamin D vázícího proteinu.

Jako další krok je přidání mikročastic, potažených streptavidinem a vitaminu D (25-OH), značeného biotinem. Dojde k zaplnění volných vitamin D vázících proteinů, označených rutheniem. Vytvoří se tak komplex složený ze značeného vitamin D vázícího proteinu a biotinylovaného vitaminu D (25-OH). Biotinylovaný vitamin D se napojí na pevnou fázi spolupůsobením biotinu a streptavidinu.

Následující část měření je nasátí reakční směsi do měřicí komůrky, ve které jsou obsaženy mikročástice, detekovány magnetickým polem na povrchu elektrody. Částice, které se nenavázaly, jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M. Dále dochází k chemiluminiscenční emisi fotonů, která vzniká přivedeným napětím na elektrodě.

Fotonásobič změří vyvolanou emisi fotonů. Kalibrační křivka, ze které jsou vyhodnoceny výsledky stanovení, je specificky navržena pro přístroj 2bodovu kalibrací. Dále jsou výsledky hodnoceny z master křivky, která je součástí čárového kódu reagentie [29].

4.3.3 Výsledné hodnoty

Analyzátor měří koncentraci analytu v jednotkách ng/ml nebo nmol/l. Převod jednotek je možný podle vzorce: $\text{nmol/l} \times 0,4 = \text{ng/ml}$

$$\text{ng/ml} \times 2,5 = \text{nmol/l}.$$

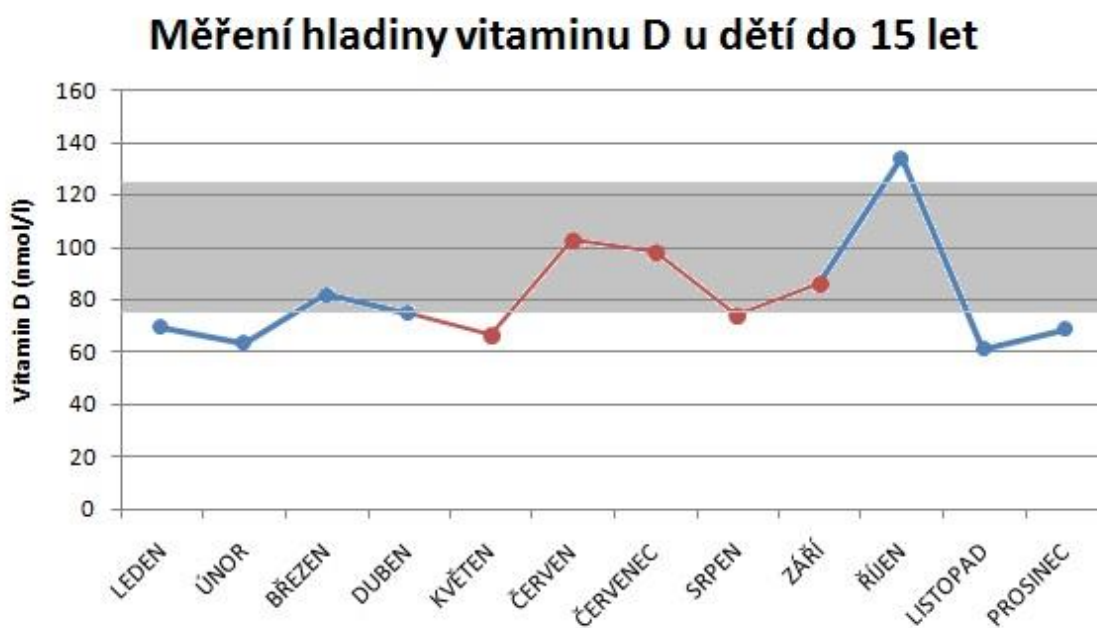
Naměřené hodnoty mohou být rozdílné, příčinou jsou standardizace mezi metodami. Při hodnocení výsledků je vhodné věnovat pozornost klinickému vyšetření. Podle odborníků je nedostatek hladiny vitamínu D definován jako vitamín D (25-OH) ≤ 50 nmol/l. Podle US NationalKidneyFoundation je definována hladina < 75 nmol/l jako nedostatek hladiny vitamínu D. Doporučená hladina vitamínu D (25-OH) je ≥ 75 nmol/l. Je důležité brát ohled na rozdílnost hladin 25-OH u pohlaví, věku, ročního období, zeměpisné šířky i etnické skupině [29].

Tabulka 2 Hodnoty 25(OH)D u dětí [18]

25-OH-D (ng/ml)	25-OH-D (nmol/l)	Hodnocení
< 12	< 30	Deficit
12–30	30–75	Insuficience
30–50	75–125	Optimum
50–80	125–200	Nadbytek
> 80	> 200	Intoxikace

5 VÝSLEDKY

Hodnoty, se kterými budeme v této kapitole pracovat, nám byly poskytnuty z Oblastní nemocnice Kladno, z laboratoře klinické biochemie. Jedná se o hodnoty 25(OH)D dětí, ve věkové kategorii od narození do 15 let. Data byly získány od počátku roku 2013, do srpna roku 2016. V této práci jsou graficky znázorněny průměrné hodnoty dětí do 15-ti let. Graf je rozdělen podle ročního období, které má vliv na příjem vitamínu D ze slunečního záření. Zhodnotíme, zda se hodnoty, stanovené v jarních a letních měsících (od dubna do srpna) vyskytují v optimálním rozmezí vitamínu D. Naopak v zimních měsících, kdy je výskyt slunečních paprsků menší, zhodnotíme výskyt vitamínu D, jehož hladiny by mohly být nižší.



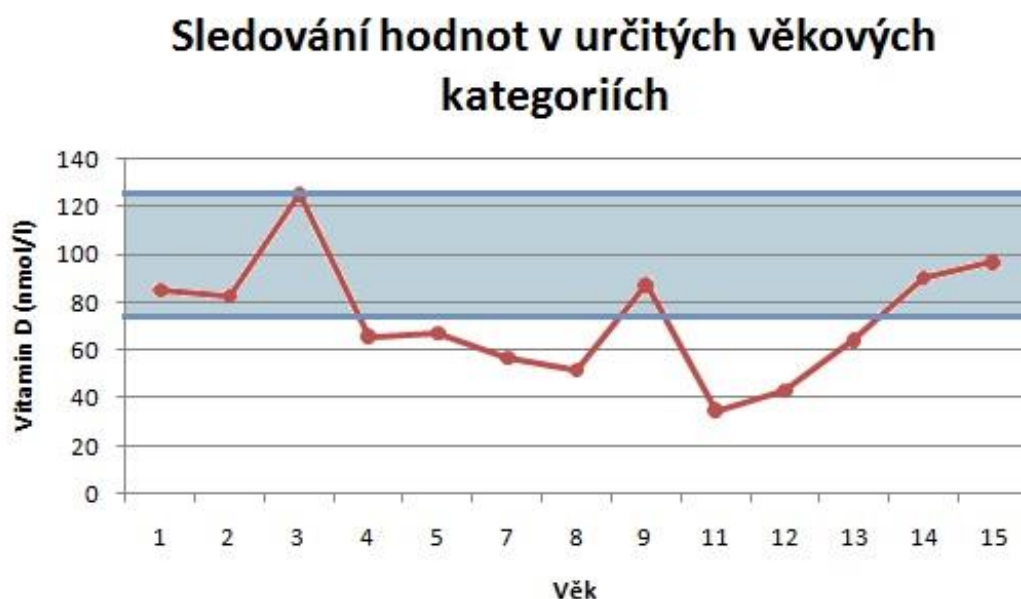
Graf 1 Měření hladiny vitamínu D u dětí do 15-ti let (Tereza Jirková, 2017)

Celkový počet hodnot, které jsme získali od začátku roku 2013 do srpna 2016, je 70. Jednotlivé hodnoty dětí jsou, podle měsíce odběru a stanovení, zprůměrovány. Můžeme tedy z grafu vypočítat, v jakém období se u měřených dětí vyskytl dostatek,

či nedostatek vitamínu D. Optimální hladina 25(OH)D pro děti, která je vyznačena v grafu šedou oblastí, je 75-125 nmol/l.

Červeně označená část křivky znázorňuje průměrné hodnoty, měřené v období od dubna do září. V těchto měsících lze získat vitamin D ze slunečního záření mnohem lépe. U dětí pohybující se každodenně venku, jsou nízké hladiny sledovaného metabolitu málo pravděpodobné. Všechny hodnoty uvedené v grafu, můžeme zařadit do optimálního rozmezí tohoto vitamínu.

Část křivky, která je značená modrou barvou, jsou průměrné hodnoty dětí, u kterých byla hladina vitamínu D sledována v podzimních a zimních měsících, přesněji od října do března. Z grafu je patrné, že tyto hodnoty jsou často vychýlené od optimální hladiny vitamínu D. Zejména v měsících říjen a listopad, kde hodnoty jasně stoupají a následně prudce klesají. Hodnoty, které klesají pod 75 nmol/l jsou považovány za nedostatečné. V grafu jsou takto nízké hodnoty patrné v únoru a listopadu, které mohou být následkem nízkého příjmu tohoto vitamínu, ať už slunečním zářením nebo potravou.

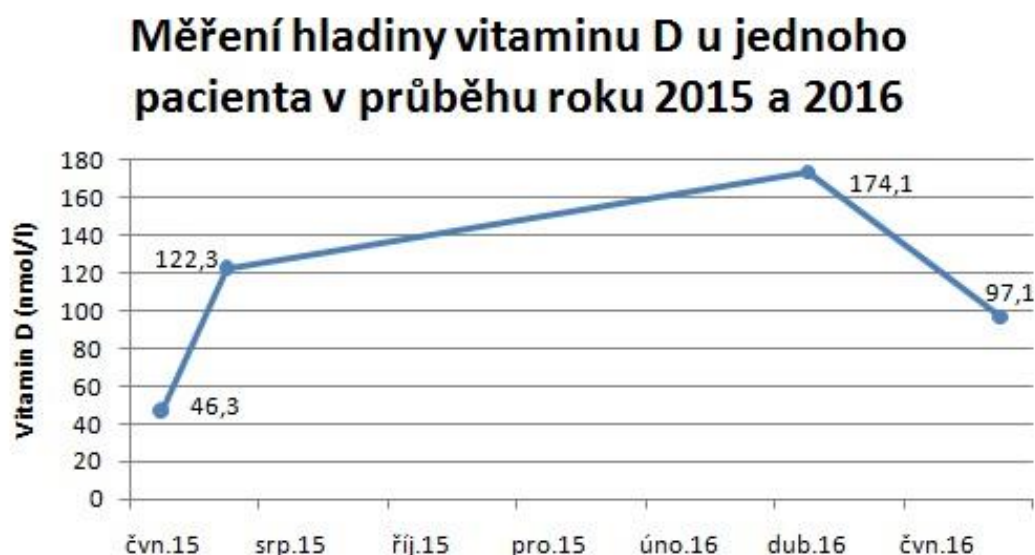


Graf 2 Sledování hodnot v určitých věkových kategoriích (Tereza Jirková, 2017)

Dále je znázorněn graf, který poukazuje na závislost věku dítěte k hodnotám vitamínu D. Podle křivky je zřejmé, že sledované hodnoty dětí do 3 let se vyskytují v referenční mezí. Nedostatečnost vitamínu D, je podle grafu u věkové kategorie 4- 8 let a 11-13 let. Velký

pokles je u dětí ve věku 11 let, kde jsou hodnoty pod 40 nmol/l. Takto nízké hodnoty značí nedostatečnost vitaminu D, kdy je doporučován vyšší příjem tohoto vitaminu a následné vyšetření pro pozorování správné hladiny vitaminu.

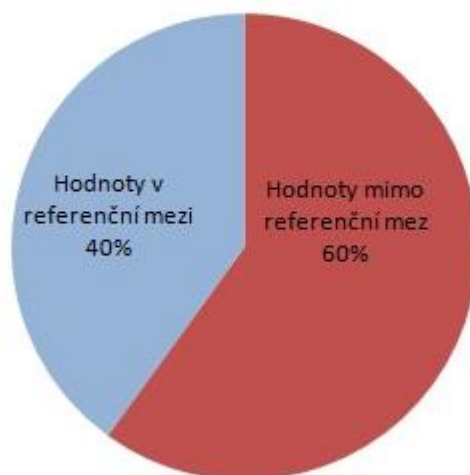
V hodnotách, které nám byly poskytnuty, jsme znázornili pacienta, který byl sledován v průběhu 2 let, od července roku 2015 do července 2016.



Graf 3 Monitorování hladiny vitaminu D u jednoho pacienta, v průběhu roku 2015 a 2016 (Tereza Jirková, 2017)

V tomto grafu jsou znázorněné přesné hodnoty, které byly stanoveny při sledování dvouletého dítěte. U dětí mladšího věku, je přísun vitaminu D velice důležitý, především pro správný vývoj kostí dítěte. Pacient, který je v grafu znázorněn, měl nejprve velmi nízkou hodnotu, a proto mu bylo doporučeno delší sledování. Po doporučení většího přísunu vitaminu D se hodnoty dostaly do optimálního rozmezí.

Poměr stanovených hodnot vitaminu D



Graf 4 Poměr stanovených hodnot vitaminu D (Tereza Jirková, 2017)

Celkově se stanovené hodnoty vyskytují mimo referenční mez. Červeně značená část grafu znázorňuje nedostatek a přebytek vitaminu D v populaci, především u dětí. Modře značená oblast vyznačuje hodnoty naměřené v optimálním rozmezí vitaminu. Podle grafu značící hodnoty, které leží mimo referenční mez, je doporučeno dbát na optimální příjem vitaminu D z potravy a ze slunečního záření. V případě častého výskytu nedostatku je doporučena suplementace.

6 DISKUZE

Pro stanovení vitamínu D se využívají metody založené na chromatografii a na imunoanalytickém stanovení, které jsou již v dnešní době plně automatizované. Imunoanalytické metody pro stanovení vitamínu D jsou nejvyužívanější. Mnoho firem (Roche, Abbott, DiaSorin) nabízí možnost stanovení tohoto vitamínu, založené na odlišných metodách. V současné době je využívána také manuální metoda radioimunoanalýzy, kde je riziko nebezpečí při práci s radioaktivitou, a u které se stanovuje metabolit 1,25-dihydroxyvitamin D. Stanovení tohoto metabolitu, který je produkován v ledvinách, je vhodné provádět při onemocnění ledvin.

Metabolit, který je v laboratoři stanovován imunologickými metodami, pro posouzení správného přísunu vitamínu D, je 25- hydroxyvitamin D (25(OH)D), který působí zejména v játrech a získává se ze slunečního záření a z potravy. Aktivace vitamínu D je složitý proces, na kterém se podílí několik metabolických kroků, a do kterého vstupuje velký počet faktorů napomáhajících ke správnému působení v organismu. Patří mezi ně množství vápníku a fosforu ve stravě, dědičné dispozice, příjem slunečního záření, správná funkce ledvin a svůj podíl má i parathormon.

U plně automatizovaných metod je podstatná část vyšetření preanalytická fáze. U stanovení tohoto metabolitu je výhodou jeho velká stabilita, při teplotě 18-25 °C zůstává stabilní po dobu 8 hodin. Na správný odběr pacienta, přepravu a manipulaci se vzorkem, je i přesto kladen velký důraz. Možný výskyt hemolýzy ve vzorku pacienta by mohl ovlivnit výsledné hodnoty. Důležité je také mít správnou teplotu reagensů před samotným měřením hodnot v analyzátoru, která se pohybuje v rozmezí 20-25 °C. Samotné měření 25(OH)D trvá přibližně 2 hodiny, vzhledem k možnému odparu vzorků a reagensů.

Pokud hodnotíme naměřené hodnoty, je nezbytné brát ohled na věk a pohlaví pacienta, na roční období, u kterého má velký význam sluneční záření, na zeměpisné šířce, ale i na etnické skupině, ve které pacient žije. Stanovení následné zhodnocení hladiny vitamínu D je důležité zejména u dětí, u kterých se vitamin D spolu s vápníkem podílí na vývoji kostí. Spolu s laboratorním vyšetřením je nezbytné provést rentgenové vyšetření, které podá informace o výsledné diagnóze, zejména pokud se u dětí vyskytují kostní deformace následkem nedostatku vitamínu D a vápníku.

V letním období, kdy je přísun slunečního záření největší, by se

neměly měřené hodnoty příliš vychylovat od optimálního rozmezí. Ve výše uvedeném grafu, můžeme vidět průměrné hodnoty, které byly od roku 2013 do roku 2016 sledovány u dětí do věku 15 let. V uvedeném grafu průměrných hodnot měřených v období jara a léta, jsou všechny hodnoty v optimálním rozmezí hladiny vitamínu D. Na správné koncentraci tohoto vitamínu se podílí zejména působení slunečního záření, které je podstatné pro dostatečný příjem tohoto vitamínu. Pokud je sledována hladina vitamínu D, je nezbytné brát ohled i na obsah přijímané stravy, u které je podstatný obsah vápníku a fosforu. Dostatečný přísun vitamínu D je doporučován již v těhotenství. Mnoho matek si udržuje dostatek tohoto vitamínu pomocí doplňků stravy, které obsahují tento vitamin.

Dále jsou z grafu patrné průměrné hodnoty metabolitu 25(OH)D u dětí během zimních a podzimních měsíců, tedy od října do února. Na této křivce jsou zřejmé časté výchyly od optimálních hodnot vitamínu D. V tomto období, kdy není velký příjem ze slunečního záření, se musí dbát na přísun vitamínu z potravy. Pokud dítě trpí častým nedostatkem tohoto vitamínu, je vhodné doplňovat stravu suplementy. Při nedostatku vitamínu v těle nedojde k jeho aktivaci a může tak dojít ke kostním onemocněním. Vitamin v organismu vydrží po dobu 25-30 dnů, ne jen cirkulací v těle, ale i uložením do svalů či tuku. Tak je možné si vytvořit přes léto zásoby do zimních měsíců.

Při nedostatku vitamínu D jsou možné malformace kostí a tím možný výskyt onemocnění křivice. První diagnostické známky tohoto onemocnění, které souvisely s lokalizací postižených, byly objeveny před 400 lety. Později byla tomuto onemocnění přiřazena souvislost mezi kostními postiženími a určitými lokalitami. Rozdíl mezi venkovem a městem, byl na projevu v kostních deformitách značný. Na venkově se křivice vyskytovala ojediněle, oproti tomu ve městě byla tato nemoc častá. U dětí, které byly vystaveny ozáření ultrafialovým zářením, došlo k zmírnění křivice. Kostní metabolismus byl zlepšen u dětí, které se vystavovaly slunečním paprskům. Tak vznikl dnes známý fakt, který říká, že křivice vzniká nedostatečným příjmem slunečního záření.

Příznaky tohoto onemocnění, které se projeví zejména na skeletu dítěte, je možné zhodnotit podle rentgenového snímku, který je nedílnou součástí celkového vyšetření při nedostatku vitamínu D u dětí. Rentgenový snímek u křivice se vyznačuje typickými známkami tohoto onemocnění, mezi které patří zejména poškození dolních končetin, dále Harrisonova rýha, rachitický růženec, kloubní změny, kyfóza při sedu či vyklenutí hrudní kosti. Křivice nevzniká pouze nedostatečným přísunem vitamínu D, svůj podíl má

na vzniku i vápník, který spolu s vitaminem D v organismu působí. Jestliže není dostatečný příjem vitaminu D, je tím omezený vznik kalcitriolu (metabolitu vitaminu D) a tím klesá vstřebávání vápníku. Tímto má tělo omezený výběr minerálu nezbytných pro vývoj kostí.

V grafu je patrná i vysoká hodnota, která přesahuje horní limit optimální hladiny, 125 nmol/l. Nadbytek vitaminu D není škodlivý, pokud není tělu dodáván po delší dobu ve vysokých koncentracích. Tak by mohlo dojít k intoxikaci vitaminem. Slunečním zářením nelze dojít k intoxikaci tímto vitaminem, na rozdíl od doplňků z farmakologického hlediska. Je ale důležité brát na vědomí, že přílišné vystavení se slunečním paprskům je nebezpečné. U hodnot, které nám poskytla Oblastní nemocnice v Kladně, jsme sledovali pacienta, kterému byly stanoveny hodnoty, v průběhu roku 2015 a 2016. Jedná se o 2leté dítě, které má ze začátku nízkou hodnotu vitaminu D, přesněji 46,3 nmol/l. Deficit tohoto vitaminu se značí pod 30 nmol/l. U tohoto pacienta je větším přísunem vitaminu D možné dosáhnout optimální hladiny. Při průběžném sledování jsou následující hodnoty naopak příliš vysoké, a to je možné velkým přísunem doplňků stravy.

Celkově byl u sledovaných hodnot porovnán poměr mezi výskytem nedostatku či přebytku vitaminu D v organismu a optimálních hodnot tohoto vitaminu. Podle grafu můžeme říct, že se u velké části dětské populace vyskytuje nedostatek či přebytek vitaminu D. Je doporučeno dbát na optimální příjem z potravy nebo působením slunečních paprsků. Především bych doporučila obeznámit děti i rodiče o působení tohoto vitaminu, doporučené dávce u dětí i o následcích z jeho nedostatečného příjmu.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnout základní údaje a poznatky o vitaminu D, jak působí tento vitamin v organismu po jeho získání ze slunečního záření nebo přísunem vhodné potravy. Práce byla zaměřena především na výskyt vitaminu D u dětí, jaké důsledky má nedostatek tohoto vitaminu na skelet dítěte a popsat tak jedno ze závažných onemocnění, postihující děti a jejich kosti, křivice.

Cílem praktické části bylo zpracovat získané hodnoty 25(OH)D a zpracovat je pomocí grafů. Graf byl vytvořen ze 70 hodnot sledovaných u dětí a rozdělen podle ročního období, u kterého můžeme vidět, jaký vliv má sluneční záření na hladiny tohoto metabolitu během letních a zimních měsíců. Dále byl graf rozdělen podle věkové kategorie dětí a zhodnocen dle souvislosti věku s hodnotami. Následně zhodnotit jak často se vyskytuje dostatek či přebytek tohoto vitaminu u dětí ve věkové kategorii od narození do 15 let. Následkem čeho se vyskytuje nedostatek či přebytek vitaminu D a jaké důsledky má nedostatek tohoto vitaminu na dětský organismus.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

%	procento
°C	stupeň Celsia (jednotka teploty)
μg	mikrogram (jednotka hmotnosti)
25(OD)D ₂	25- hydroxyvitamin D ₂
25(OH)D	25- hydroxyvitamin D
25(OH)D ₃	25- hydroxyvitamin D ₃
ALP	alkalická fosfatáza
Ca ²⁺	vápenatý kationt
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
DBP	globulin- vitamin D vážící protein
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymová imunoanalýza
g	gram (jednotka hmotnosti)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ID	izotopová diluce
ID-LC- MS	izotopová diluce spojená s kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií
IU	mezinárodní jednotka (jednotka obsahu vitamínu v potravinách)
LC- MS/MS	detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií
mg	miligram (jednotka hmotnosti)
MHC	MHC molekula (major histocompatibilitycomplex)
ml	mililitr (jednotka objemu)
mmol/l	milimol na litr (jednotka koncentrace)
nkat/l	nanokatal na litr (jednotka katalytické aktivity enzymů)

nm	nanometr (jednotka délky)
pg/ml	pikogram na mililitr (jednotka koncentrace)
PO_4^{3-}	fosforečný aniont
PTH	parathormon
RIA	radioimunoanalýza
Th1	subpopulace pomocných helper TH lymfocytů
Th2	subpopulace pomocných helper TH lymfocytů
VDDR I	vitamin D- dependentní rachitida typu I
VDDR II	vitamin D- dependentní rachitida typu II
VDR	receptor vitaminu D

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SOBOTKA, Luboš. Vitaminy. *Interní medicína pro praxi*, 2003, roč. 5, č. 2, s. 61-67. ISSN: 1212-7299.
2. ROKYTA, Richard et al. *Fyziologie*. Třetí, přepracované vydání. Praha: Galen, 2016. ISBN 978-80-7492-238-1.
3. FAJFROVÁ, Jana. Vitaminy a jejich funkce v organismu. *Interní medicína pro praxi*, 2011, roč 13, č.12, s. 466-468.. Březsko: Solen, 1999- . ISSN: 1212-7299; 1803-5256 (elektronická verze)
4. HLÚBIK, Pavol — FAJFROVÁ, Jana. Vitaminy dětského věku. *Praktické lékařství*, 2005, č. 2, s. 104-106. ISSN: 1801-2434.
5. LEDVINA, Miroslav a kolektiv. *Biochemie pro studující medicíny*. Vydání první, druhý díl (kapitola 14-23). Praha: Karolinum, 2014. ISBN 80-246-0850-2.
6. ŽAMBOCH, Jan. *Vitamíny*. Praha: Grada, 1996. ISBN 80-7169-322-7.
7. BROULÍK, Petr. *Osteoporóza: osteoporóza, osteomalacie, osteodystrofie*. Praha: Maxdorf, 1999. ISBN 80-85800-93-4.
8. HLÚBIK, Pavel a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4
9. VEDOUCÍ AUTORSKÉHO KOLEKTIVU a Josef HOUŠTĚK. *Dětské lékařství: Učebnice pro lékařské fakulty*. Vydání třetí. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0032-6.
10. BAYER, Milan. Vitamin D v pediatrické praxi. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. Praha: Strategie, 2010. Roč. 12, příloha 2. ISSN 1212-4184
11. STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová*. Praha: Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-469-8
12. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany: H&H,1995. ISBN 80-85787-36-9.
13. GLORIEUX, Francis H. *Rickets*. New York: RavenPress, c1991. ISBN 0-88167-809-0.
14. ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: GradaPublishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.

15. RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. Vydání druhé, přepracované. Ilustrovala Ing. Ivana Hupáková. Praha: Galén, 2016. ISBN 80-7262-324-9.
16. *Medical tribune: aktuální - nezávislá - mezinárodní*. Praha: Medical Tribune CZ, 2004-. ISSN:1214-8911
17. BAYER, Milan. Rachitis - prevence a terapie. *Vox pediatrics*, 2004, Roč. 4, č. 2, s. 27-28. ISSN: 1213-2241
18. CIRMANOVÁ, Veronika. Možnosti pozitivního ovlivnění kostní hmoty u dětí, současný pohled na křivice. *Pediatric pro praxi*, 2014, roč. 15, č. 5, s. 287-290. ISSN: 1213-0494.
19. KALVACHOVÁ, Božena. Vitamin D v dětství a dospívání – pět okruhů působnosti. *Pediatric pro praxi*, 2015, roč. 16, č. 4, s. 221-223. ISSN: 1213-0494.
20. SOCHOROVÁ, Klára — BARTUŇKOVÁ, Jiřina. Vitamin D a imunitní systém – teorie a vlastní zkušenosti. *Interní medicína pro praxi*, 2007, roč. 9, č. 1, s. 28-30. ISSN: 1212-7299.
21. KRAGBALLE, Knud. *Vitamin D in dermatology*. New York: Marcel Dekker, [2000]. xii, 360 stran, 16 nečíslovaných stran: ilustrace; 24 cm. ISBN: 0-8247-7704-2.
22. KUBÁT, Rudolf. *Ortopedie dětského věku*. Praha: Avicenum, 1982.
23. HLÚBIK, Pavol — FAJFROVÁ, Jana. Vitamin D – aktuální situace. *Interní medicína pro praxi*, 2008, roč. 10, č. 6, s. 295-297. ISSN: 1212-7299
24. Wallace AM, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* (2010)
25. OPOLČAN, Ondřej a kolektiv. *Vitamin D [online]*. Tribun EU, 2012 [cit. 17.5.2017]. ISBN 978-80-263-0321-3. Dostupné z: http://www.endokurzy.cz/usr/files/vitamin-d-final_v2.pdf
26. ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.
27. DiaSorin, 1,25-dihydroxyvitamin D, In: [kcsolid.cz](http://www.kcsolid.cz) [online]. 2010 [cit. 17.5.2016]. Dostupné z: http://www.kcsolid.cz/zdravotnictvi/in_vitro/navody-2010/cz/kostni_metabolismus/1,25-DihydroxyvitaminD.pdf

28. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
29. RocheDiagnostics, Vitamin D Total II, In: roche-diagnostics.cz [online]. 19. 4.2017[cit.17.5.2015].Dostupné z:http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/produkty/PD/cobas_4000/cobas%20e411_ceska_brozura.pdf.Path: Produkty; Cobas e4000; Příbalové letáky metod; Vitamin D Total II.
30. FRIEDECKÝ, Bedřich. Vitamin D - současný stav preanalytiky, analytiky a postanalytiky. *FONS*, 2009, roč. 19, č. 4, s. 38-39. ISSN: 1211-7137.
31. *Laboraktuell: časopis pro klienty RocheDiagnostics v České a Slovenské republice*. Praha : RocheDiagnostics, 2003- . ISSN: cnb001758103; 1214-7672.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1- Schéma ozáření 7- dehydrocholesterolu a jeho přeměny na provitamin D ₃ a následný vznik vitamínu D ₃ ^[13]	13
Obrázek 2- Vznik a hydroxylace vitamínu D ₃ ^[12]	14
Obrázek 3- Schéma regulace metabolismu a funkce vitamínu D ^[13]	14
Obrázek 4- Příznaky popsané na dítěti s křivicí ^[8]	20
Obrázek 5- Typicky vypadající děti s křivicí. Dítě uprostřed je v normálu, bez onemocnění. U dětí na kraji se vyskytují projevy křivice svalovou slabostí a kostní deformací- zakřivené nohy (vpravo), vylomená kolena (vlevo) ^[21]	21
Obrázek 6- Vlevo- snímek horní končetiny při rentgenovém vyšetření- rozvláknění rozšířených metafýz dlouhých kostí- rachitické pohárky ^[17]	24
Obrázek 7- Vpravo- typický rachitický růženec (rozšířené zakončení žeber) u rentgenového snímku 4letého chlapce s křivicí ^[13]	24
Obrázek 8- Vlevo- snímek sedmiměsíčního chlapce s křivicí. Úplná absence zcostnatění dolní a horní části stehenní kosti a horní části holenní kosti ^[13]	24
Obrázek 9- Vpravo- typická Harrisonova rýha a žabí břicho ^[18]	24
Obrázek 10- Dvojčata s vitamin D- dependentní rachitidou typu II, projevující se typickou alopecií, která se rozvinula během 1 roku života ^[22]	28
Obrázek 11- Analyzátor Cobas e411 od firmy Roche ^[31]	36

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1- Příklady potravin obsahující vitamin D ^[3]	12
Tabulka 2- Hodnoty 25(OH)D u dětí ^[14]	37

12 SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ

Graf 1- Měření hladiny vitamínu D u dětí do 15-ti let(Tereza Jirková ,2017)	38
Graf 2- Sledování hodnot v určitých věkových kategoriích (Tereza Jirková, 2017)	39
Graf 3- Monitorování hladiny vitamínu D u jednoho pacienta, v průběhu roku 2015 a 2016 (Tereza Jirková, 2017)	40
Graf 4- Poměr stanovených hodnot vitamínu D (Tereza Jirková, 2017)	41